

# INVESTIGACIONES ETNOBOTÁNICAS, FITOQUÍMICAS, ANTIOXIDANTES Y PRECLÍNICAS EN CINCO PLANTAS MEDICINALES QUE SE CONSUMEN COMO ANTIDIABÉTICAS EN MACHALA, PROVINCIA DE EL ORO, ECUADOR

## ETHNOBOTANICAL, PHYTOCHEMICAL, ANTIOXIDANT AND PRECLINICAL INVESTIGATIONS IN FIVE MEDICINAL PLANTS CONSUMED AS ANTIDIABETICS IN MACHALA, EL ORO PROVINCE, ECUADOR

KEYLA MORENO MALDONADO<sup>1</sup>, CARMITA JARAMILLO JARAMILLO<sup>1</sup>, MAYRA MOREIRA<sup>1</sup>, SIMÓN GASTÓN GARCÍA<sup>1</sup>, LUISA ROJAS DE ASTUDILLO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Técnica de Machala, Planta Piloto de Farmacia y Bioterio Piloto, Machala, Ecuador,

<sup>2</sup>Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Departamento de Química, Cumaná, Venezuela.  
E-mail: lrojas40@yahoo.com

### RESUMEN

La diabetes representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. En Ecuador la diabetes ocupa uno de los primeros lugares como causa de fallecimientos. La comunidad hace uso de las plantas medicinales para tratar la diabetes, pero sin ninguna comprobación científica. Los datos acerca de las plantas usadas como antidiabéticas fueron recolectados mediante encuestas a expendedores y consumidores en mercados de venta de plantas medicinales y a la comunidad de Machala, Provincia El Oro, Ecuador. La acción antidiabética y la toxicidad aguda de las plantas medicinales fueron evaluadas usando ratas Wistar (hembras) y ratones OF1 (hembras), respectivamente. Los metabolitos secundarios y la capacidad antioxidante fueron determinados cuantitativamente a las plantas que resultaron antidiabéticas en el estudio preclínico. La información obtenida de las encuestas permitió identificar las plantas que mayoritariamente son denominadas como antidiabéticas, las partes de las plantas usadas y forma de consumo para el tratamiento de la diabetes. Las plantas *Artemisia absinthium*, *Cynara scolymus*, *Schkuhria pinnata*, *Chuquiraga jussieui* y *Taraxacum officinale* fueron las que en porcentaje coincidieron entre los expendedores y los consumidores que son las mayormente utilizadas para el tratamiento de la diabetes. Sin embargo, solamente las plantas *C. scolymus*, *A. absinthium* y *T. officinale* presentaron actividad antidiabética en las ratas y no mostraron toxicidad aguda preclínica a la dosis de 2.000 mg/kg. Este estudio evidencia que las plantas con actividades antioxidantes pueden ser una terapia efectiva para prevenir y contrarrestar una enfermedad crónica como es la diabetes.

**PALABRAS CLAVE:** Herbalistas, diabetes, metabolitos secundarios, toxicidad.

### ABSTRACT

Diabetes is a serious public health problem worldwide. In Ecuador, diabetes is one of the first causes of human deaths. The community makes use of medicinal plants to treat diabetes, but without any scientific evaluation. Data about plants with antidiabetic activity were collected from oral surveys to herbalist retailers and consumers. Antidiabetic activity and acute toxicity were evaluated using Wistar rats (females) and OF1 (females) mice, respectively. The secondary metabolites and antioxidant capacity were quantitatively determined in plants with antidiabetic activity demonstrated in the preclinical study. The information obtained from oral surveys led to the identification of the medicinal plants that were mainly denominated as antidiabetics, the parts of the plants used and form of consumption for the treatment of diabetes. The plants *Artemisia absinthium*, *Cynara scolymus*, *Schkuhria pinnata*, *Chuquiraga jussieui* y *Taraxacum officinale* were mostly nominated for the treatment of diabetes. However, only *A. absinthium*, *C. scolymus* and *T. officinale* presented antidiabetic activities and did not show preclinical acute toxicity in experimental animals at doses of 2000 mg/kg. This study shows that plants with antioxidant activities can be an effective therapy to prevent and fight chronic diseases such as diabetes.

**KEY WORDS:** Herbalists, diabetes, secondary metabolites, toxicity.

### INTRODUCCIÓN

La *diabetes mellitus* es un desorden metabólico en el sistema endocrino, constituye un serio problema de salud pública, tiene una prevalencia elevada, más de 347 millones de personas tiene diabetes y es una de las primeras

causas de morbimortalidad por sus complicaciones a medio y largo plazo, más del 80% de las muertes por diabetes se producen en países de ingresos bajos y medios. Según proyecciones de la Organización Mundial de la Salud, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030 (Jarald *et al.* 2008, OMS

2014).

En Ecuador, las enfermedades crónico-degenerativas representan un grave problema de salud pública, según datos del censo del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), en el año 2013, la *diabetes mellitus* y las enfermedades hipertensivas son las que ocupan los primeros lugares como causas de fallecimientos, con 7,44% y 6,64%, respectivamente.

El tratamiento de la *diabetes mellitus* se realiza con insulina y/o drogas antihiper glucemiantes. Sin embargo, la recuperación total de los pacientes diabéticos con esos tratamientos no se ha reportado hasta la fecha. Por lo que cada día más personas exploran la posibilidad de usar terapia alternativa con plantas para complementar la farmacoterapia convencional antidiabética (Haddad *et al.* 2001, Yeh 2003, Ahmad *et al.* 2009). Se ha observado un especial interés por el empleo de plantas medicinales de larga historia en la medicina popular para tratar diabetes y que pueden ser una fuente útil para el desarrollo de agentes hipoglucemiantes orales seguros y eficaces (Dahanukar *et al.* 2000, Sánchez y Genta 2007, Cefalu *et al.* 2011, Esquivel-Gutiérrez *et al.* 2012).

Más de 350 plantas se han registrado que se utilizan en el tratamiento de la *diabetes mellitus*, pero este uso está asociado a informaciones ancestrales, sólo un pequeño número de plantas han recibido una valoración científica y médica para evaluar su eficacia (Ahmad *et al.* 2009). De esto se deduce que se requieren investigaciones científicas y estudios farmacológicos más exhaustivos que demuestren la efectividad y justifiquen el uso empírico de las plantas medicinales en el control de la *diabetes mellitus* (Sánchez y Genta 2007, Surya *et al.* 2014).

Esta investigación es un aporte para evaluar si las plantas medicinales, seleccionadas de acuerdo a un estudio etnobotánico, tienen actividad antidiabética, caracterizada a partir de los descensos normalizados de glucosa sanguínea en los animales de experimentación y si presentan los metabolitos y la capacidad antioxidante que favorecen esa actividad. Además, dado que la dosis, los efectos secundarios y la eficacia de la mayoría de las preparaciones de las plantas medicinales consideradas como antidiabéticas no están definidas, a pesar del uso común y frecuente basado en la creencia de que son seguros porque son naturales, se determinó en las plantas medicinales seleccionadas su toxicidad aguda, empleando parámetros toxicológicos preclínicos en animales de experimentación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de las plantas medicinales

Las plantas medicinales con mayor porcentaje de utilización tradicional como antidiabéticas se seleccionaron mediante la recopilación de información, obtenida a través de encuestas dirigidas a 30 expendedores y 155 consumidores que asistieron a los locales de venta de plantas medicinales en Machala, Provincia de El Oro, durante el segundo semestre del 2013. Durante los estudios de campo, todos los encuestados fueron informados acerca del objetivo del estudio.

La encuesta fue elaborada por los investigadores como un cuestionario estructurado con alternativas de respuestas por marcar y preguntas abiertas para respuestas libres. Se recopiló la información escrita, tanto a los expendedores como a los consumidores, acerca de cuáles plantas medicinales mayoritariamente comercializan o compran, respectivamente, para tratar la diabetes, su procedencia, sus nombres comunes, su nombre científicos, sus propiedades, en qué estado (seco, fresco o como fórmula farmacéutica) los clientes la solicitan, si es como fórmula farmacéutica qué laboratorio la prepara y si tiene permiso sanitario, en qué forma recomienda consumirla (infusión, decocción, extracto, cataplasma, como alimento), la dosis y de dónde obtuvo la información para esa recomendación. También se preguntó si venden o compran los productos naturales con prescripción médica y a los compradores si siguen las instrucciones de consumo que le recomienda el expendedor.

Las plantas medicinales seleccionadas de acuerdo con la información de los cuestionarios de los expendedores y consumidores fueron: *Artemisia absintium*, *Chuquiraga jussieui*, *Cynara scolymus*, *Schkuhria pinnata* y *Taraxacum officinale*. Estas plantas fueron compradas en estado fresco, en el mercado de Machala, Provincia El Oro. De cada planta se utilizaron sólo las hojas, éstas se lavaron con agua destilada y secadas en una estufa (MEMMERT SNB 400 con flujo de aire) a 37°C por 24 horas. Luego, se pulverizaron con un molino (Lab. Mill serial No. 56969, Type AR 400 Erweka®, Germany) y se tamizaron a  $\leq 2$  mm.

### Evaluación de parámetros de calidad de la droga cruda de las plantas medicinales

La evaluación de los parámetros de calidad (humedad, sustancias solubles, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en

ácido clorhídrico) se realizó según las normas de la Organización Mundial de la Salud (WHO 2011).

### **Obtención del extracto acuoso de la droga cruda de plantas medicinales**

Se preparó el extracto acuoso de las plantas medicinales, en estudio, por el método de infusión, basado en la información proporcionada por las encuestas. Para ello, se sumergió el material vegetal molido (25 g) en 200 mL de agua destilada caliente, a una temperatura próxima a la de ebullición, hasta un tiempo máximo de una hora, después de lo cual se filtró. El extracto se usó el mismo día. Se determinaron la densidad relativa, el pH y los sólidos totales (WHO 2011).

### **Determinación de fenoles totales**

Se utilizó el método sugerido por Cai *et al.* (2004), con algunas modificaciones. Para la curva de calibración se prepararon una serie de soluciones patrones de ácido gálico, con concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Para el análisis de la muestra, 2 mL del extracto acuoso, previamente diluidos 1:50 con etanol, fueron mezclados con 1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadieron 0,5 mL de solución de carbonato de sodio al 5%, se agitó y enrasó con agua destilada hasta 10 mL. Después de 30 minutos de reacción se hicieron las determinaciones espectrofotométricas a 760 nm. Todos los análisis fueron hechos por triplicados. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes a ácido gálico/g de material seco de plantas.

### **Determinación cuantitativa de flavonoides**

Se realizó usando el método de Feltrin *et al.* (2012). 1,0 mL del extracto se mezcló con 2 mL  $\text{AlCl}_3$  al 2% y 3,0 mL de metanol, dejándose en reposo por 1 hora. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. A partir de un estándar de rutina (1000 mg/L), disuelto en metanol, se prepararon las soluciones patrones de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. La absorbancia de la muestra y de los patrones se leyeron espectrofotométricamente a la longitud de onda de 420 nm.

### **Determinación cuantitativa de alcaloides**

Se utilizó el método basado en la reacción con verde de bromocresol (BCG) (Shamsa *et al.* 2008, Ajanal *et al.* 2012). 5 mL del extracto de la planta se transfirieron a un embudo de separación y fueron adicionados 5 mL de una solución de verde de bromocresol junto con 5 mL de una solución

buffer de fosfato (pH 4,7). La mezcla se agitó y el producto formado fue extraído con 2, 2, 3 y 3 mL de cloroformo, agregado cada volumen consecutivamente y recogidos en un matraz aforado de 10 mL y enrasado con cloroformo. Todos los análisis se hicieron por triplicado. Para la curva de calibración se usó atropina (1 mg/mL) como estándar. La absorbancia del complejo formado y disuelto en cloroformo fue medida en un espectrofotómetro de absorción a una longitud de onda de 470 nm.

### **Determinación cuantitativa de glucósidos cianogénicos**

Para la determinación cuantitativa de cianuro se utilizó la metodología sugerida por Oliveros-Bastidas *et al.* (2009). 0,5 g de muestra de hojas frescas individuales de la planta se colocaron en un recipiente cerrado, previa adición de 1 mL tolueno, cubriendo todas las hojas. Luego fueron agregados 50 mL de agua destilada y calentado hasta 90°C, en ese momento se adicionaron 4 mL de HCl al 3,7%, se continuó el calentamiento 5 minutos más para garantizar la liberación total del HCN. El HCN liberado fue arrastrado por vapor y recogido en un tubo que contenía 5 mL de una solución de picrato de sodio a pH 11,8. La solución resultante se aforó a 10 mL con agua desionizada, se dejó en reposo por 60 minutos y luego se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis SHIMADZU (mini-1240), a 550 nm, longitud de onda de máxima absorción. Notándose la presencia de CN por el cambio de color amarillo a naranja-rojo. Las curvas de calibración se obtuvieron usando soluciones de NaCN en agua en un intervalo de concentraciones de 1-10  $\mu\text{g/mL}$ . Se prepararon tres curvas de calibración a diferentes tiempos. Calculando el coeficiente de regresión  $r^2$  de la curva y el coeficiente de variación (CV) de cada patrón medido. La repetibilidad se efectuó con seis réplicas en cada muestra, determinando el coeficiente de variación. De manera similar, se determinó la repetibilidad intermedia usando otro equipo y otro operador. Por medio de la técnica de adición de analito, se determinó el porcentaje de recuperación. Estos ensayos fueron realizados por triplicado.

### **Determinación cuantitativa de saponinas**

Se usó el método referido por Guerra *et al.* (2001), el cual es una determinación espectrofotométrica directa de saponinas basado en la propiedad de estos compuestos de romper la pared celular de los glóbulos rojos de la sangre (hemólisis). Para la curva de calibración se preparó una solución de saponinas de *Quillaja saponaria* de concentración 0,2 mg/mL en una solución buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de pH 7,4. A partir de

esta solución, se prepararon las soluciones patrones de 0,030; 0,025; 0,020; 0,015; 0,010 y 0,005 mg/mL y leídas sus absorbancias a 630 nm. Las concentraciones de saponinas se expresaron en mg equivalentes a las de *Quillaja saponaria* por gramo de material seco de plantas.

#### **Determinación de la actividad inhibidora del radical libre 1,1-difenil-2-picril hidracilo (DPPH) método modificado de Brand-Williams *et al.* (1995)**

Para la realización de la curva de calibración se utilizó al ácido ascórbico como patrón, en un intervalo de concentraciones de 10 a 100 µg/mL. De cada una de estas concentraciones se tomó 0,5 mL y se le adicionó 1,5 mL de DPPH, se dejó en reposo por 5 minutos y se leyeron las absorbancias a 517nm. 1,5 mL de una solución metanólica de DPPH también se mezclaron con 0,5 mL de las soluciones hidro-etanólica (50:50) en varias concentraciones de las muestras. Las soluciones se dejaron en reposo y en ausencia de luz, durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se leyeron las absorbancias respectivas a 517 nm. Los resultados fueron relacionados con la referencia del ácido ascórbico.

#### **Evaluación preclínica de la actividad antidiabética del extracto acuoso de las plantas medicinales en estudio**

Se siguieron los procedimientos descritos por el CYTED (1995), para medir la inducción de hiperglucemia y la determinación del efecto hipoglucemiante, usando el extracto acuoso de: *Artemisia absinthium*, *Cynara scolymus*, *Schkuhria pinnata*, *Chuquiraga jussieui* y *Taraxacum officinale*. La glucosa se determinó mediante tiras reactivas ACCU-CHEK y leídas mediante el glucómetro ROCHE. Para el manejo de los animales se siguieron las normas establecidas por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales (CCPA 2012). Se utilizaron como animales de experimentación ratas albinas Wistar (hembras), con un peso entre 200 y 250 g, procedentes del Bioterio Piloto de la Universidad Técnica de Machala.

Los animales se distribuyeron en grupos de forma aleatoria, cada uno constituido por 5 animales: Grupo 1. Animales sin tratamiento; Grupo 2. Animales tratados con solución de glucosa al 40%; Grupo 3. Animales tratados con Metformina (500 mg/kg); Grupo 4. Animales tratados con extracto acuoso de *Artemisia absinthium* en dosis de 1.000 mg/kg Grupo 5. Animales tratados con extracto acuoso de *Cynara scolymus* en dosis de 1.000 mg/kg; Grupo 6. Animales tratados con extracto acuoso de

*Schkuhria pinnata* en dosis de 1.000 mg/kg; Grupo 7. Animales tratados con extracto acuoso de *Chuquiraga jussieui* en dosis de 1.000 mg/kg; Grupo 8. Animales tratados con extracto acuoso de *Taraxacum officinale* en dosis de 1.000 mg/kg.

Después de una hora se le administró, por vía intraperitoneal, la solución de glucosa al 40%, se esperó 15 minutos para comprobar si los animales estaban hiperglucémicos, luego se realizaron las lecturas en intervalos de tiempo de 30, 60 y 120 minutos, las cuales permitieron determinar el efecto hipoglucemiante de los extractos acuosos de las plantas en estudio.

#### **Evaluación de la toxicidad aguda de las plantas con propiedades antidiabéticas**

Se desarrolló la metodología descrita por la OECD (2001). Para la realización del ensayo se empleó, como animal de experimentación, ratones OF1 (hembras), con peso entre 20 y 25 g, al inicio del ensayo, procedentes del Bioterio Piloto de la Universidad Técnica de Machala. Los animales se mantuvieron en cuarentena y aclimatados según lo establecido y distribuidos aleatoriamente en grupos de tres animales, respectivamente para cada una de las plantas en estudio. En el ensayo se confeccionó un grupo tratado (tres hembras) que recibieron el producto en estudio (extracto de plantas medicinales). Tres o cuatro horas antes de empezar el ensayo se retiró la comida de los animales, transcurridas las horas de ayuno se comenzó la prueba, para ello, previamente, se pesó a cada uno de los animales a tratar y de esta manera se tuvo una dosificación exacta de acuerdo al peso de las mismas. Las sustancias que se administraron fueron los extractos de las plantas que resultaron ser normoglucemiantes (*A. absinthium*, *C. scolymus* y *T. officinale*), a la dosis límite de 2.000 mg/kg de peso del animal, de manera tal que se suministró en el estudio una toma de 0,4 mL aproximadamente, garantizando de esta manera dar la dosis máxima, según lo reportado por la OECD (2001). Transcurridas 2 a 3 horas de la administración de la sustancia se procedió a colocar nuevamente la comida. Después de la administración, se realizaron las observaciones de los signos clínicos, registrados sistemáticamente en los récords individuales para cada animal, varias veces durante el primer día y al menos una vez al día los 13 días restantes.

Atendiendo a que la vía de administración fue la oral, se incluyeron los signos de toxicidad retardada. Las pesadas de los ratones se realizaron en los tiempos siguientes: 1, 7 y 14 días. También se efectuaron observaciones de los órganos (pulmones, corazón, bazo, riñones, estómago, útero y anexos), obtenidos de la necropsia de cada

uno de los animales que se sacrificaron en una cámara saturada de éter, evitando en lo posible que el sufrimiento del animal, cumpliendo de esta manera con el principio de las 3 Rs (Reemplazo,

### Análisis estadístico

Los grupos fueron contrastados estadísticamente empleando un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple y la prueba Student Newman Keuls ( $p < 0,05$ ) (López-Planes 1994).

## RESULTADOS

La aplicación de las encuestas a los consumidores y vendedores de la ciudad de Machala, permitieron hacer la selección de las plantas medicinales con actividad antidiabética.

Se encuestaron a 30 vendedores de estas especies vegetales y se obtuvieron las respuestas que se describen a continuación. El 90% de los expendedores tienen más de cinco años comercializando estas plantas; el 30% de los encuestados conoce el nombre científico de las plantas medicinales.

Los resultados acerca del conocimiento de las propiedades antidiabéticas de las plantas

Reducción y Refinamiento) (Vinardell Martínez-Hidalgo 2007).

empleadas para tratar la diabetes por parte de los expendedores, para lo cual el 100% de los encuestados afirman conocer las propiedades de estas plantas medicinales, hecho que favoreció esta investigación para la selección y evaluación preclínica de la actividad hipoglucemiante.

En la Figura 1 se refiere a la fuente de información en la que se fundamentan los expendedores de plantas medicinales de la ciudad de Machala para recomendar el uso de plantas medicinales a los consumidores, para lo cual es importante destacar que el 55% de los vendedores se basa en el conocimiento popular, 27% emplean como fuente de información la TV, prensa, textos, un 9% asiste a charlas donde reciben información médica y un 9% que se informa a través de otros medios como es el internet. En virtud de estos resultados se concluye que los expendedores de las plantas medicinales no poseen conocimiento científico. La mayoría de ellos sólo tiene instrucción primaria (78%) y secundaria (22%); por lo tanto, la comercialización, las indicaciones y recomendaciones para el uso de las plantas las hacen fundamentándose en los conocimientos tradicionales de las plantas.

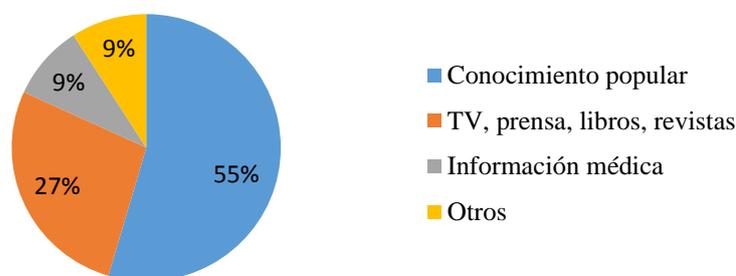


Figura 1. Fuente de información acerca del uso de plantas medicinales.

Las plantas que más se expenden en Machala, con porcentajes superiores, son las siguientes: *Cynara scolymus* 17%, *Taraxacum officinale* 14%, *Schkuhria pinnata* 14%, *Artemisia absintium* y *Chuquiraga jussieui* 11%; entre 3-9% las siguientes plantas: *Verbena officinalis*, *Junglans regia*, *Equisetum arvense*, *Cissus verticillata*, *Stevia rebaudiana bertonii*, *Gentianella alborosea* y *Vernonanthura patens*. Estas plantas son las más recomendadas, por parte de los vendedores, para regular los niveles de glucosa en la sangre.

Adicionalmente, los resultados de la encuesta reflejan que el 53% de los consumidores prefieren las plantas medicinales antidiabéticas en estado fresco y el estado seco con 47%. De la forma de consumir las plantas medicinales antidiabéticas, la infusión fue la de mayor utilización, con el 67%, quedando entre 7-13% la decocción, extracto y cataplasma. La condición de preparación sugerida por parte de los expendedores de plantas medicinales fue también la de infusión.

Con relación a la dosificación del consumo de

plantas medicinales para la diabetes, el 45% de los expendedores de plantas medicinales indican a los usuarios la dosis de tres copas diarias por nueve días, el 22% la dosis de dos tazas diarias, el 22% recomiendan beber agua de tiempo por un mes y, en menor proporción, el 11% sugieren beber el extracto por un día.

En cuanto a la venta de fitofármacos elaborados a partir de plantas medicinales, específicamente para la diabetes, que se expenden en los centros naturistas de la ciudad, el mayor porcentaje *Cynara scolymus* (11%) y en menor proporción las plantas medicinales *Geranium ayavacense*, *Gentianella alborosea*, *Abuta grandifolia*, *Smilax glabra*, *Taraxacum officinale*, *Phyllanthus niruri*, *Momordica charantia*, *Stevia rebaudiana bertonii*, *Fleurya aestuans*, *Allium cepa*, *Uncaria tomentosa*, *Allium sativum*, *Eucalyptus globulus*, *Pelargonium zonale* y *Junglans regia*. De las formas farmacéuticas sólidas, las tabletas son las que predominan, con el 41%, seguido de los jarabes, como la forma farmacéutica líquida, con el 35%.

De los resultados con respecto a la venta de productos naturales con acción antidiabética, con o sin receta médica, en los centros naturistas, el 75% de los encuestados respondió que la venta de estos fitofármacos se realiza sin prescripción médica, mientras que el 25% lo hace con receta médica.

Se consideró a los consumidores de plantas medicinales y se encuestaron a 155 compradores de estas plantas con actividad antidiabéticas y que realizan su adquisición semanalmente en Machala. Las plantas *Taraxacum officinale*, *Artemisia absinthium* y *Cissus verticillata* son las de mayor consumo, con 11%; con 9-6% *Cynara scolymus*, *Chuquiraga jussieui*, *Schkuhria pinnata*, *Stevia rebaudiana*, *Costus spicatus*, *Fleurya aestuans* y *Equisetum arvense*, con 3% *Solanum melongena*, *Petroselinum crispum*, *Apium graveolens*, *Aerva sanguinolenta*, *Aristolochia pilosa*, *Momordica charantia* y *Anacardium occidentale*.

De los resultados de las encuestas, se seleccionaron las cinco plantas que coincidieron en mayor porcentaje entre los expendedores y los consumidores, las cuales fueron *Artemisia absinthium*, *Cynara scolymus*, *Schkuhria pinnata*, *Chuquiraga jussieui*, *Taraxacum officinale*. Estas plantas pertenecen a la familia Compositae (Asteraceae). La forma como compran los consumidores las plantas medicinales, específicamente para la diabetes, en estado fresco, con 67%, y el 33% en estado seco, lo que

concuera con la información dada por los expendedores. La forma de administración es por el método de infusión, con el 92%, lo que permite saber que la comunidad se basa a este método de dosificación popular.

De los resultados de los parámetros de calidad evaluados a los extractos acuosos de *Artemisia absinthium*, *Cynara scolymus*, *Schkuhria pinnata*, *chuquiraga jussieui*, *Taraxacum officinale*, no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el contenido de sustancias solubles en el medio acuoso y en las soluciones hidroalcohólicas de 30°, 70°, 50°; por lo tanto, se definió el agua como solvente para la obtención de los extractos de las plantas en estudio, concordando con los resultados de las encuestas que señalan el método de infusión en medio acuoso.

Las cenizas totales (< 12%), cenizas solubles en agua (< 8%) y cenizas insolubles en ácido clorhídrico (< 1%), se encuentran dentro de los parámetros referenciales (WHO 2011).

Los valores de pH estuvieron entre 5 y 6, siendo levemente ácidos los extractos. En los porcentajes de los sólidos totales *Cynara scolymus*, *Schkuhria pinnata*, *Chuquiraga jussieui* y *Taraxacum officinale* obtuvieron valores de porcentajes entre 10 y 12%, *Artemisia absinthium* el porcentaje estuvo por debajo de 10%, los cuáles están aceptables, según WHO (2011).

La Figura 2 representa la curva de tolerancia de glucosa producto del tratamiento de las ratas con los extractos de las plantas en estudio. En la determinación de la glucosa, en el tiempo cero, se evidenció que todas las ratas en los diferentes tratamientos se encontraron dentro de los rangos normales para la especie (85-132 mg/dL) (CCPA 2012), por lo que no se detectaron diferencias estadísticas significativas, es decir estaban aptas para ser utilizadas en el ensayo.

Transcurridos 15 minutos de la administración de la glucosa al 40%, por la vía intraperitoneal, se realizó el mismo procedimiento y se halló que, excepto a los animales que no recibieron tratamiento, los valores de la glucosa estaban por encima del valor normal de la especie (132 mg/dL) (CCPA 2012), pero al procesarlos estadísticamente no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos: 3, 4, 5; 6 y el grupo 1; es decir, diferían biológicamente, pero no desde el punto de vista estadístico. Cuando se compararon éstos y los animales de los grupos 2; 7 y 8 (que no presentaron diferencias entre ellos) sí la tuvieron. Es de destacar que, a pesar de recibir la glucosa, los valores obtenidos para los animales tratados con los extractos de las

plantas: *A. absinthium*, *C. scolymus* y *T. officinale* que se hallaban por encima del límite superior de la normalidad, en caso alguno se consideraron como diabéticos, como se reporta en la literatura para los roedores (300 mg/dL) (CYTED 1995), sus valores fueron muy similares a los de la Metformina (3-(diaminometilideno)-1,1-dimetilguanidina), el cual es un fármaco oral insulino-sensibilizador utilizado en el tratamiento de la *Diabetes mellitus* tipo 2. Se utiliza en más de 90 países y ha llegado a ser el segundo fármaco más prescrito para el tratamiento de la *Diabetes mellitus* tipo 2. Al no ser causante de hipoglucemia, algunos la clasifican como normogluceante (Bailey *et al.* 1996, Salazar-

Álvarez 2011). A los 30 minutos se observó que en los animales que recibieron la Metformina y de los extractos acuosos de *A. absinthium*, *C. scolymus* y *T. officinale*, los efectos antihiperglucemiantes eran similares; es decir, demostraron poseer actividad normogluceante, mientras que los extractos de *Chuquiraga jussieui* y *Schkuhria pinnata* no presentaron efecto biológico antidiabético. Los animales que recibieron solamente glucosa al 40%, mostraron una hiperglucemia de 440 mg/dL, muy superior al límite que se establece para considerarlos como diabéticos (CYTED 1995).

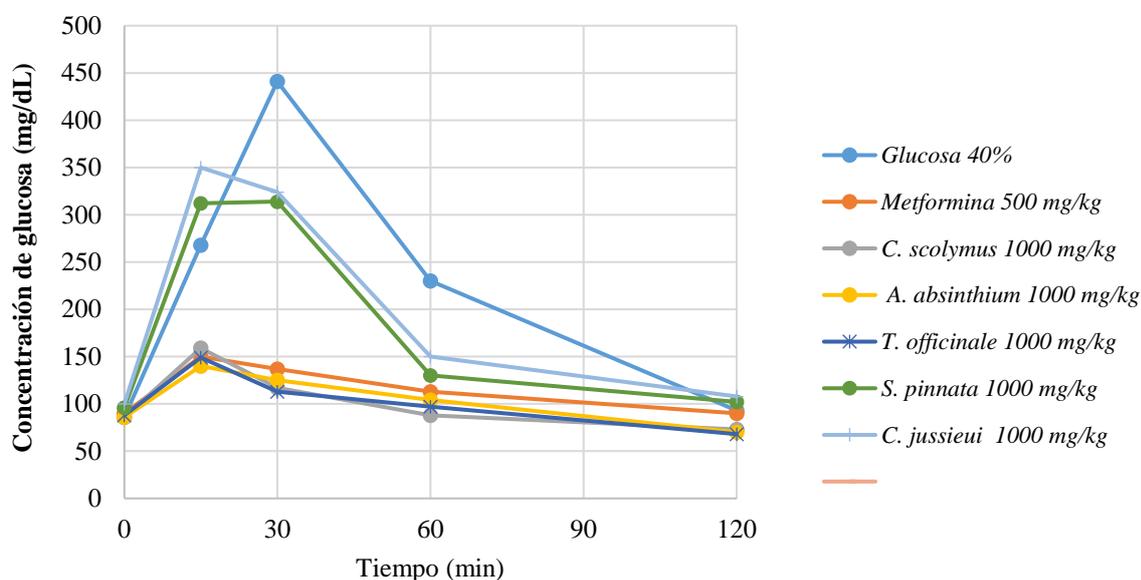


Figura 2. Curva de tolerancia de glucosa producto del tratamiento de las ratas con los extractos de las plantas medicinales en estudio.

Después de 60 minutos, la concentración de la glucosa en la sangre de los animales continuó descendiendo, por lo que a este tiempo no se presentaron diferencias biológicas entre los grupos (1; 3; 4; 5; 6; 7), a excepción del grupo tratado con *Chuquiraga jussieui*, el cual mantuvo los valores de glucosa significativamente más altos ( $p < 0,05$ ). Finalmente, a los 120 minutos se observó que los valores de la glucosa de las ratas, en todos los casos, estuvieron dentro de los parámetros normales.

Del estudio de toxicidad, los grupos de animales tratados con las tres plantas medicinales que presentaron actividad antidiabética, obtuvieron ganancia en peso. Las muestras de corazón, bazo, pulmones, riñones, estómago, útero, ovarios y anexos no presentaron

alteraciones. En ninguno de los casos se observó la presencia de signos clínicos, tales como: mudanza de pelo, temblores, convulsiones, salivación, somnolencia, entre otros; y no hubo muerte de animales.

Los resultados de la determinación cuantitativa de metabolitos secundarios están reflejados en la Tabla 1. El extracto de *A. absinthium* presentó la mayor concentración de alcaloides. Las más altas concentraciones de fenoles totales (22,30 mg/g) y taninos (11,7 mg equivalente a A.G/g materia seca) se detectaron en *T. officinale*. La planta de menor concentración de taninos fue *C. scolymus* (0,2 mg equivalente a A.G/g materia seca). *T. officinale* presentó la mayor concentración de glucósidos cianogénicos, mientras que *A. absinthium* mostró la menor

concentración. Los resultados indican que *C. scolymus* es la especie con menor contenido de saponinas.

La actividad antioxidante de las tres plantas que resultaron positivas como antidiabéticas se expresó como IC<sub>50</sub> (µg/mL) (cantidad necesaria

para inhibir la formación de radicales DPPH en un 50%) y los resultados se presentan en la Tabla 2. La planta medicinal con mayor capacidad antioxidante es *C. scolymus* (9,89 µg/mL); seguida de *A. absinthium* (28,4 µg/mL) y luego *T. officinale* (37,3 µg/mL).

Tabla 1. Concentraciones de los metabolitos secundarios determinados en extractos de plantas medicinales con actividad antidiabética.

Nombre científico	Metabolitos secundarios					
	Alcaloides (mg/g)	Fenoles (mg/g)	Flavonoides (mg/g)	Taninos (mg/g)	Glucósidos cianogénicos (µg/g)	Saponinas (mg/g)
<i>A. absinthium</i>	1,07 ± 0,01	5,60 ± 0,70	1,90 ± 0,01	1,40 ± 0,02	0,51 ± 0,02	3,90 ± 0,04
<i>C. scolymus</i>	0,99 ± 0,04	0,90 ± 0,10	1,44 ± 0,02	0,20 ± 0,01	1,03 ± 0,01	1,81 ± 0,02
<i>T. officinale</i>	0,33 ± 0,01	22,3 ± 0,2	4,21 ± 0,03	11,7 ± 0,04	1,42 ± 0,03	3,50 ± 0,01

Tabla 2. Valores de IC<sub>50</sub> de las plantas medicinales con actividad antidiabética.

Planta medicinal	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>C. scolymus</i>	9,89
<i>A. absinthium</i>	28,4
<i>T. officinale</i>	37,3

## DISCUSIÓN

Los expendedores se basan en el conocimiento popular o tradicional para recomendar y dosificar las plantas medicinales antidiabéticas, lo que demuestra que existe bajo conocimiento validado, ya que no recurren a otros medios más avanzados. Estos resultados ponen de manifiesto que los expendedores de estas plantas no están debidamente capacitados con bases científicas validadas; por consiguiente, pueden causar daños tóxicos por el uso incorrecto de formas de preparación, dosificación y frecuencias de tiempo de la ingesta. También, la mayor parte de los productos que se expenden en los centros naturistas son recomendados a los consumidores por parte del comerciante debido a su experiencia y conocimiento popular.

Los resultados de este estudio fueron comparados con otros de etnobotánica (Schütz *et al.* 2006, Jarald *et al.* 2008, Güneş y Özhata 2011), determinando que las plantas seleccionadas por los expendedores y consumidores, las cuales resultaron positivas en este estudio, también son usadas en otros países como antidiabéticas.

Estos resultados tienen relación con los resultados del análisis cuantitativo de metabolitos

secundarios de las plantas y se explica el comportamiento de las plantas en el ensayo de la actividad antidiabética, que fue positiva para *C. scolymus*, *A. absinthium* y *T. officinale*. En concordancia con otras investigaciones, los resultados corroboran que las plantas *A. absinthium*, *C. scolymus* y *T. officinale* pueden ser efectivamente usadas para el tratamiento de la diabetes (Nazni *et al.* 2006, Yarnell y Abascal 2009, Heidarian y Soofiniya 2011, Jayasimha-Goud *et al.* 2011).

En cuanto al contenido de alcaloides, varios estudios cualitativos han evidenciado la presencia de alcaloides en extractos de *T. officinale* (Mir *et al.* 2013), *A. absinthium* (Javed *et al.* 2012) y *C. scolymus* (Jacociunas *et al.* 2014). En el tamizaje fitoquímico de *C. scolymus* realizado por Vicedo *et al.* (2014) también identificaron la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas.

Los valores de taninos oscilaron de 0,20 a 11,7 mg/g, los cuales son significativamente diferentes en cuanto a su calidad nutricional y se consideran aceptables para su consumo, por no afectar adversamente la digestión (Diagayete y Hus 1981). Los resultados muestran que el contenido de fenoles totales de *T. officinale* es similar al obtenido por Makkar *et al.* (2009), pero más alto que el encontrado por Sengul *et al.* (2009) y por Ghaima *et al.* (2013).

Los niveles de HCN en las muestras de las plantas evaluadas se encuentran por debajo del valor considerado como dosis potencialmente peligrosa (10 µg HCN/g de material vegetal fresco) para los seres humanos (FAO/WHO 1991). Sin embargo, es importante que los

extractos de las plantas sean dosificados por un determinado tiempo para evitar alteraciones en el sistema nervioso central (Smith 1964, Nwokoro *et al.* 2010). Los reportes de las concentraciones de cianuro en las plantas analizadas son escasos, por lo que es primordial esta evaluación de la cantidad de glucósidos cianogénicos presentes para evitar las intoxicaciones por cianuro.

Aunque no hay diferencias significativas entre las tres plantas que presentaron actividad antidiabética, *C. scolymus* es la que presenta mayor actividad antioxidante. Comparando los resultados con los de Cruzado *et al.* (2013), *C. scolymus* de Ecuador posee una alta actividad antioxidante. Además, en el extracto acuoso de estas tres plantas se comprobó que no presentaron toxicidad aguda preclínica a la dosis de 2.000 mg/kg en los animales de experimentación.

Las plantas positivas como antidiabéticas (*A. absinthium*, *C. scolymus*, *T. officinale*), en esta investigación, también contienen flavonoides equivalentes a rutina. Este tipo de flavonoides mostró actividad antihiper glucémica y antioxidante en ratas diabéticas (Niture *et al.*, 2014) y la suplementación con este flavonoide en pacientes diabéticos, además de bajar los niveles de azúcar en sangre, también disminuyó la presión arterial sanguínea y los niveles de colesterol LDL e incrementó los del colesterol HDL (Sattanathan *et al.* 2011). Por lo que el uso de estas plantas medicinales, como antidiabéticas, también proporcionan otros beneficios de salud a los consumidores, por el contenido de flavonoides equivalentes a rutina (Sharma *et al.* 2013, Al-Dhabi *et al.* 2015).

Varios estudios han demostrado una correlación lineal entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante (Katsube *et al.* 2004, Djeridane *et al.* 2006, Katalinic *et al.* 2006), mientras otras investigaciones (Czapecka *et al.* 2005, Wong *et al.* 2006) muestran pobre correlación lineal o reportan la actividad antioxidante y el contenido de fenoles, pero no comentan alguna relación. En este estudio, los extractos de las plantas con menores concentraciones de fenoles totales, fueron las que presentan mayores actividades antioxidantes, indicando que existen otros compuestos no fenólicos con esta actividad. A pesar que los compuestos antioxidantes no fenólicos representan una clase importante y abundante de captadores de radicales libres en los organismos vivos (Foti y Amorati 2009, Mekni *et al.* 2013), existen pocos estudios sobre este tipo de compuestos químicos naturales.

La diabetes está asociada al incremento en la

formación de radicales libres (Naziro y Butterworth 2005). Por lo tanto, este estudio evidencia que las plantas con mayores actividades antioxidantes son una terapia efectiva para prevenir y contrarrestar una enfermedad crónica como es la diabetes y pueden reducir o prevenir la formación de radicales libres que inducen daños oxidativos en varias biomoléculas que incluyen proteínas, lípidos, lipoproteínas y el ADN (Yang *et al.* 2010, Bora y Sharma 2011).

Esta investigación está en correspondencia con la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de que el uso de plantas para el tratamiento de la *diabetes mellitus* debe ser evaluado en función de su eficacia y seguridad para estandarizar su uso (OMS 2002).

## CONCLUSIONES

Con este estudio se demostró que las plantas *S. pinnata* y *C. jussieui*, consideradas por los encuestados como antidiabéticas, no poseen ese efecto en las ratas albinas Wistar (hembras). Sin embargo, se verifica que tres plantas medicinales: *A. absinthium*, *C. scolymus* y *T. officinale* poseen acción hipoglucemiante, evaluadas con los ensayos preclínicos y la actividad antioxidante, coincidiendo los conocimientos ancestrales con los científicos.

Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia del efecto antidiabético, la capacidad antioxidante y no toxicidad a la concentración de 2.000 mg/kg de las plantas *C. scolymus*, *A. absinthium* y *T. officinale*.

Estos resultados de bajas toxicidades pueden ser debido a que las concentraciones tóxicas de glucósidos cianogénicos, alcaloides y saponinas son bajas a las dosis de 2.000 mg/kg.

Esta investigación es una contribución para el desarrollo racional de la medicina natural de bajo efecto adverso, bajo costo y de alto valor biológico, para contrarrestar la alta incidencia de *diabetes mellitus* en el mundo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen de manera especial al Proyecto Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República del Ecuador por su patrocinio en este trabajo, al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) por su apoyo con el suministro de las ratas Wistar y al Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Ecuador.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD M, QURESHI R, ARSHAD M, KHAN M, MUHAMMAD ZAFAR M. 2009. Traditional herbal remedies used for the treatment of diabetes from district Attock (Pakistan). *Pakistan J. Bot.* 41(6):2777-2782.
- AJANAL M, GUNDKALLE M, NAYAK S. 2012. Estimation of total alkaloid in *Chitrakadivati* by UV-Spectrophotometer. *Anc. Sci. Life.* 31(4):198-201.
- AL-DHABI NA, ARASU MV, PARK CH, PARK SU. 2015. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI J.* 14:59-63.
- BAILEY C, PATH M, TURNER R. 1996. Metformin. *N. Engl. J. Med.* 334(9):574-579.
- BORA KS, SHARMA A. 2011. Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharm. Biol.* 49(12):1216-1223.
- BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSET C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28(1):25-30.
- CAI Y, LUO Q, SUN M, CORKE H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74(1):2157-2184.
- CCPA (CONSEJO CANADIENSE DE PROTECCIÓN DE ANIMALES). 2012. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. OLFERT ED. CROSS BM, MCWILLIAM AA. (Eds.). Segunda edición, vol. 1. Disponible en línea en: [http://www.fcv.unl.edu.ar/media/institucional/comite\\_etica\\_seguridad/documentos/ManualsobrelcuidadoyusodeanimalesdeexperimentacionConsejo20Canadiense.pdf](http://www.fcv.unl.edu.ar/media/institucional/comite_etica_seguridad/documentos/ManualsobrelcuidadoyusodeanimalesdeexperimentacionConsejo20Canadiense.pdf). (Acceso 12.03.2016).
- CEFALU W, STEPHENS J, RIBNICKY D. 2011. Diabetes and herbal (Botanical) medicine. *In: BENZIE IFF, WACHTEL-GALOR S.* (Eds.). *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, EUA, Chapter 19.
- CRUZADO M, PASTOR A, CASTRO N, CEDRON J. 2013. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). *Rev. Soc. Quím. Perú.* 79(1):58-62.
- CYTED (CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO) 1995. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. Editor R. Pinzón. 45-49, pp. 63-69.
- CZAPECKA E, MARECZEK A, LEJA M. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem.* 93(2):223-226.
- DAHANUKAR S, KULKARNI R, REGE N. 2000. Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian J. Pharmacol.* 32(4):S81-S118.
- DJERIDANE A, YOUSFI M, NADJEMI B, BOUTASSOUNA D, STOCKER P, VIDAL N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97(4):654-660.
- DIAGAYETE M, HUSS W. 1981. Tannin contents of African pasture plants: Effects on analytical data and *in vitro* digestibility. *Ani. Res. Dev.* 15:79-90.
- ESQUIVEL-GUTIÉRREZ E, NORIEGA-CISNEROS R, BELLO-GONZÁLEZ M, SAAVEDRA-MOLINA A, SALGADO-GARCIGLIA R. 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas* 14(1):45-52.
- FAO/WHO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION). 1991. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission XII. Supplement 4 FAO, Rome, Italy.
- FELTRIN A, BOLIGON V, JANOVIK M. 2012. Antioxidant potential, total phenolic and flavonoid contents from the stem bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. *Asian J. Biol. Sci.* 5(5):1-5.
- FOTI M, AMORATI R. 2009. Non-phenolic radical-trapping antioxidants. *J. Pharm. Pharmacol.* 61(11):1435-1448.
- GHAIMA K, HASHIM N, ALI S. 2013. Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *J. App. Pharm. Sci.* 3(05):96-99.

- GUERRA J, NOGUEIRAS C, DELGADO R, HERNÁNDEZ O. 2001. Determinación cuantitativa de saponinas y azúcares reductores del *Agave brittoniana* T. Rev. Cuba. Quim. 13(3):37-42.
- GÜNES F, ÖZHATA N. 2011. An ethnobotanical study from Kars (Eastern) Turkey. BioDiCon. 4(4):30-41.
- HADDAD P, DEPOT M, SETTAF A, CHERRAH Y. 2001. Use of Antidiabetic Plants in Morocco and Québec. Diabetes Care. 24(3):608-609.
- HEIDARIAN E, SOOFINIYA Y. 2011. Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Med. Plants Res. 5(13):2717-2723.
- JACOCIUNAS L, DIHL R, LEHMANN M, DE BARROS FALCÃO FERRAZ A, RICHTER M, DA SILVA J, DE ANDRADE H. 2014. Effects of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf and bloom head extracts on chemically induced DNA lesions in *Drosophila melanogaster*. Genet. Mol. Biol. 37(1):90-104.
- JARALD E, BALAKRISHNAN S, CHANDRA D. 2008. Diabetes and herbal medicines. Iranian J. Pharmacol. Ther. 7(1):97-106.
- JAVED A, MIR S, NAQUI R. 2012. Preliminary pharmacognostical standardization of aerial parts of *Artemisia absinthium* linn. Int. Res. J. Pharm. 3(1):217-220.
- JAYASIMHA-GOUD B, DANAMMA B, NIZAMUDDIN B, DAYANANDA K, SWAMY B. 2011. Hypoglycemic activity of a methanol extract of *Artemisia absinthium* leaves in experimental rats. Int. J. Appl. Pat. Recog. 2(7):307-312.
- KATALINIC V, MILOS M, JUKIC M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem. 94(4):550-557.
- KATSUBE T, TABATA H, OHTA Y, YAMASAKI Y, ANUURAD E, SHIWAKU K, YAMANE Y. 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. J. Agr. Food Chem. 52(8):2391-2396.
- LÓPEZ-PLANES R. 1994. Diseño Estadístico de experimentos. Yucatán. México Coedición de la Universidad Autónoma de Yucatán y la Universidad de la Habana, pp. 25-75.
- MAKKAR H, NORVSAMBUU T, LKHAGVATSEREN S, BECKER K. 2009. Plant secondary metabolites in some medicinal plants of Mongolia used for enhancing animal health and production. Tropicultura. 27(3):159-167.
- MEKNI M, AZEZ R, TEKAYA M, MECHRI B, HAMMAMI M. 2013. Phenolic, non-phenolic compounds and antioxidant activity of pomegranate flower, leaf and bark extracts of four Tunisian cultivars. J. Med. Plants Res. 7(17):1100-1107.
- MIR M, SAWHNEY S, JASSAL M. 2013. Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale*. Wudpecker J. Pharma. Pharmacol. 2(1):1-5.
- NAZIRO L, BUTTERWORTH P. 2005. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. Can. J. Appl. Physiol. 30(2):172-185.
- NAZNI P, POONGODI-VIJAYAKUMAR T, ALAGIANAMBI P, AMIRTHAVENI M. 2006. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Cynara Scolymus* among selected Type 2 Diabetic Individuals. Pak. J. Nutr. 5(2):147-151.
- NITURE NT, ANSARI AA, NAIK SR. 2014. Anti-hyperglycemic activity of rutin in streptozotocin-induced diabetic rats: an effect mediated through cytokines, antioxidants and lipid biomarkers. Indian J Exp Biol. 52(7):720-727.
- NWOKORO O, OGBONNA J, UBANI C, OKPALA G, OFODILE O. 2010. Determination of cyanide in *Amanitia muscaria* samples using alkaline picrate method. Pak. J. Nutr. 9 (2):134-136.
- OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OLIVEROS-BASTIDAS A, CARRERA C, MARÍN D. 2009. Estudio por espectrofotometría UV-VIS de la reacción entre los iones cianuro y picrato. Un ejemplo práctico de aplicaciones

- analíticas y estudios cinéticos. *Rev. Colomb. Quim.* 38(1):61-82.
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2002. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra. Disponible en línea en: <http://www.sld.cu/sitios/revsalud/temas.php?idv=1190>. (Acceso 12.03.2016).
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2014. Diabetes. Centro de Prensa. Nota descriptiva N°312. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>. (Acceso 12.03.2016).
- SALAZAR-ÁLVAREZ Y. 2011. Uso de la metformina en la diabetes mellitus tipo II. *Rev. Cubana Farm.* 45(1):157-166.
- SÁNCHEZ S, GENTA S. 2007. Yacon: un potencial producto natural para el tratamiento de la diabetes. *B. Latinoam. Caribe Pl.* 6(5):162-164.
- SATTANATHAN K, DHANAPAL CK, UMARANI R, MANAVALAN R. 2011. Beneficial health effects of rutin supplementation in patients with diabetes mellitus. *J. App. Pharm. Sci.* 01(08):227-231.
- SCHÜTZ K, CARLE R, SXHIEBER A. 2006. *Taraxacum* - a review on its phytochemical and pharmacological profile. *J. Ethnopharmacol.* 107(3):313-323.
- SENGUL M, YILDIZ H, GUNGOR N, CETIN B, ESER Z, ERCISLI S. 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(1):102-106.
- SHAMSA F, MONSEF H, GHAMOOSHI R, VERDIAN-RIZI M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J. Pharm. Sci.* 32(1-2):17-20.
- SHARMA S, ALI A, ALI J, SAHNI JK, BABOOTA S. 2013. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 22(8):1063-79.
- SMITH A. 1964. Cyanide encephalopathy in man. *Lancet.* 284(7361):668-670.
- SURYA S, SALAM AD, TOMY DV, CARLA B, KUMAR RA, SUNIL C. 2014. Diabetes mellitus and medicinal plants - a review. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4(5):337-347.
- VICEDO L, RODRIGUES R, LEHMANN M, DE BARROS A, FRANÇOIS M, DA SILVA J, RODRIGUES DE ANDRADE H. 2014. Effects of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf and bloom head extracts on chemically induced DNA lesions in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Biol.* 37(1):90-104.
- VINARDELL MARTÍNEZ-HIDALGO M. 2007. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: Situación actual. *Acta Bioeth.* 13(1):41-52.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2011. Quality control methods for medicinal plant materials - Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/document/s/h1791e/h1791e.pdf>.
- WONG L, CHENG K, CHEN F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 97(4):705-711.
- YANG Q, PAN X, KONG W, YANG H, SU Y, ZHANG L, ZHANG Y, YANG Y, DING L, LIU G. 2010. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem.* 118(1):84-89.
- YARNELL E, ABASCAL K. 2009. Dandelion (*Taraxacum officinale* and *T mongolicum*). *Integr Med.* 8(2):35-38.
- YEH G. 2003. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care.* 26(4):1277-1294.